

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
BACHARELADO INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DO MAR

THAÍS RAFAEL DE OLIVEIRA

**EFEITOS CELULARES EM *Mytella charruana* EXPOSTOS A SEDIMENTOS
CONTAMINADOS COM HPAs EM CENÁRIOS FUTUROS DE ACIDIFICAÇÃO E
AQUECIMENTO DO MEIO MARINHO**

SANTOS
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
BACHARELADO INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DO MAR

THAÍS RAFAEL DE OLIVEIRA

**EFEITOS CELULARES EM *Mytella charruana* EXPOSTOS A SEDIMENTOS
CONTAMINADOS COM HPAs EM CENÁRIOS FUTUROS DE ACIDIFICAÇÃO E
AQUECIMENTO DO MEIO MARINHO**

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel Interdisciplinar em Ciências e Tecnologia do Mar, Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Brasil Choueri

SANTOS

2021

Ficha catalográfica elaborada por sistema
automatizado com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

O48 Rafael de Oliveira, Thaís.

 EFEITOS CELULARES EM Mytella charruana EXPOSTOS
A SEDIMENTOS CONTAMINADOS COM HPAs EM CENÁRIOS
FUTUROS DE ACIDIFICAÇÃO E AQUECIMENTO DO MEIO

MARINHO. / Thaís Rafael de Oliveira; Orientador
Rodrigo Brasil Choueri; Coorientador . -- Santos,
2021.

 37 p. ; 30cm

 TCC (Graduação - Bacharelado Interdisciplinar em
Ciências e Tecnologia do Mar) -- Instituto do Mar,
Universidade Federal de São Paulo, 2021.

CDD 551.46

Bibliotecária Daianny Seoni de Oliveira – CRB
8/7469

RESUMO

Ecossistemas marinhos experimentam alterações ambientais importantes no Antropoceno, como elevação da temperatura e acidificação das águas. Estas alterações despertam preocupação e movimentam esforços no sentido de compreender seus efeitos sobre a biota. Aliada a estas transformações ambientais, os ecossistemas marinhos sofrem ainda efeitos de outros estressores, incluindo a contaminação química. Os efeitos destes três estressores atuando sinergicamente sobre a vida marinha é ainda apenas hipotetizado. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar respostas de biomarcadores bioquímicos (danos em DNA e peroxidação lipídica) nas brânquias de *Mytella charruana* (Mollusca: Mytellidae) expostos a um cenário de aquecimento e acidificação previsto para o ano de 2100, devido ao aumento da concentração de CO₂ no meio marinho, junto à contaminação química por HPAs no sedimento. Os organismos-teste foram expostos a sedimentos fortificados em laboratório com uma mistura de HPAs (Benzo[a]pireno e Acenafteno) e seus respectivos controles, em combinações de duas temperaturas (25°C e 27°C) e três níveis de pH (7.5, 7.1 e 6.7). Os tratamentos foram acidificados através da injeção controlada de CO₂ gasoso puro no meio experimental. Após 96h de exposição, as brânquias dos indivíduos foram removidas para análise de danos em DNA através da quantificação da fragmentação do DNA (ensaio de precipitação alcalina), e peroxidação lipídica (LPO) através da quantificação de malondialdeído (método TBARs). Os dados foram analisados utilizando a PERMANOVA multifatorial para identificar possíveis interações entre contaminação, temperatura e pH. Efeitos interativos entre pH e contaminação só foram observados nos tratamentos com temperatura de 27°C. O pH foi o fator que exerceu maior influência na produção das respostas analisadas, apresentando efeitos nas duas temperaturas testadas. Houve um aumento significativo das respostas de danos em DNA e LPO no controle acetona em relação ao contaminado com HPAs nos níveis de pH 6.7 à temperatura de 27°C, cenário mais estressante testado, podendo ser uma resposta de supercompensação dos mecanismos de defesa dos organismos-teste. Com isso, pode-se concluir que o pH (sem interação com a contaminação), no pH mais baixo testado, afeta de forma discreta os organismos provocando danos em DNA e LPO, podendo ser intensificado pelo aumento da temperatura.

Palavras-chave: biomarcadores; mudanças climáticas; poluição; dióxido de carbono; HPAs;

ABSTRACT

Marine ecosystems experience important environmental changes in the Anthropocene, such as rising temperatures and acidifying waters. These changes arouse concern and make efforts to understand its effects on biota. In addition to these environmental changes, marine ecosystems are also affected by other stressors, including chemical contamination. The effects of these three stressors acting synergistically on marine life are still only hypothesized. Therefore, the objective of the present study was to evaluate responses of biochemical biomarkers (DNA damage and lipid peroxidation) in the gills of *Mytella charruana* (Mollusca: Mytellidae) exposed to a warming and acidification scenario predicted for the year 2100, due to the increase in CO₂ concentration in the marine environment, along with chemical contamination by PAHs in the sediment. The test organisms were exposed to laboratory-fortified sediments with a mixture of PAHs (Benzo [a] pyrene and Acenaftene) and their respective controls, in combinations of two temperatures (25 ° C and 27 ° C) and three pH levels (7.5, 7.1 and 6.7). The treatments were acidified by the controlled injection of pure CO₂ gas in the experimental medium. After 96h of exposure, the gills of the individuals were removed for DNA damage analysis by quantifying DNA fragmentation (alkaline precipitation assay), and lipid peroxidation (LPO) by quantifying malondialdehyde (TBARs method). The data were analyzed using PERMANOVA multifactorial to identify possible interactions between contamination, temperature and pH. Interactive effects between pH and contamination were only observed in treatments with a temperature of 27 ° C. PH was the factor that exerted the greatest influence on the production of the analyzed responses, with effects on the two temperatures tested. There was a significant increase in DNA and LPO damage responses in acetone control compared to those contaminated with PAHs at pH 6.7 levels at 27 ° C, the most stressful scenario tested, which may be an overcompensation response of the organisms' defense mechanisms -test. With this, it can be concluded that the pH (without interaction with the contamination), in the lowest tested pH, slightly affects the organisms causing damage to DNA and LPO, which can be intensified by the temperature increase.

Keywords: biomarkers; climate changes; pollution; carbon dioxide; PAHs;

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Desenho experimental mostrando os níveis de variação de cada um dos três fatores testados.....13
- FIGURA 2** - Foz do rio Itaguaré, Bertioga (SP). Imagem de satélite obtida pelo software Google Earth Pro.....14
- FIGURA 3** - Níveis de danos em DNA. Média e desvio padrão (n=8) dos resultados de biomarcadores a HPAs e controle acetona em três níveis de pH (6.7, 7.1 e 7.5) e dois níveis de temperatura (25°C e 27°C). Asteriscos representam diferença significativa do tratamento HPA em relação ao controle acetona, dentro de cada nível de pH. Diferenças significativas entre os níveis de pH são representadas por letras diferentes, sendo que as letras em caixa baixa representam comparações entre níveis de pH dentro do tratamento controle acetona e letras em caixa alta representam comparações entre níveis de pH dentro do tratamento de exposição a HPAs. Gráfico obtido utilizando o software GraphPad Prism 5.....23
- FIGURA 4** - Níveis de LPO. Média e desvio padrão (n=8) dos resultados de biomarcadores a HPAs e controle acetona em três níveis de pH (6.7, 7.1 e 7.5) e dois níveis de temperatura (25°C e 27°C). Asteriscos representam diferença significativa do tratamento HPA em relação ao controle acetona, dentro de cada nível de pH. Diferenças significativas entre os níveis de pH são representadas por letras diferentes, sendo que as letras em caixa baixa representam comparações entre níveis de pH dentro do tratamento controle acetona e letras em caixa alta representam comparações entre níveis de pH dentro do tratamento de exposição a HPAs. Gráfico obtido utilizando o software GraphPad Prism 5.....25

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Concentrações nominais das substâncias fortificadas nos sedimentos-teste.....	15
TABELA 2- Parâmetros físico-químicos de controle de qualidade dos ensaios. Cntrl Sed= Controle sedimento; Cntrl Acet = Controle co-solvente acetona; HPAs= sedimento fortificado com a mistura de Benzo[a]pireno e Acenafteno; Cntrl Temp= Controle temperatura.....	19
TABELA 3- Composição de espécies carbonáticas e alcalinidade total nas amostras de água dos tratamentos para temperatura 25°C.....	20
TABELA 4- Composição de espécies carbonáticas e alcalinidade total nas amostras de água dos tratamentos para temperatura 27°C.....	21
TABELA 5- Resultados do teste principal da PERMANOVA da variável dependente danos em DNA, exposição a 25°C. O teste foi bifatorial, considerando todos os pHs (6.7, 7.1 e 7.5) e respectivos tratamentos de HPAs (controle acetona e fortificado com B[a]P e Ac). Os valores em negrito indicam $p < 0,05$	22
TABELA 6- Resultados do teste pareado do efeito do pH da PERMANOVA da variável dependente danos em DNA, exposição a 25°C. O teste foi bifatorial, considerando todos os pHs (6.7, 7.1 e 7.5). Os valores em negrito indicam $p < 0,05$	23
TABELA 7- Resultados do teste principal da PERMANOVA da variável dependente danos em DNA, exposição a 27°C. O teste foi bifatorial, considerando todos os pHs (6.7, 7.1 e 7.5) e respectivos tratamentos de HPAs (controle acetona e fortificado com B[a]P e Ac). Os valores em negrito indicam $p < 0,05$	23
TABELA 8- Resultados do teste pareado do efeito da interação entre pH e sedimento contaminado por HPAs da PERMANOVA da variável dependente danos em DNA, exposição a 27°C. O teste foi bifatorial, considerando todos os pHs (6.7, 7.1 e 7.5) e respectivos tratamentos de HPAs (controle acetona e fortificado com B[a]P e Ac). Cntrl Acet= Controle acetona. Os valores em negrito indicam $p < 0,05$	23
TABELA 9- Resultados do teste principal da PERMANOVA da variável dependente LPO, exposição a 25°C. O teste foi bifatorial, considerando todos os pHs (6.7, 7.1 e 7.5) e respectivos tratamentos de HPAs (controle acetona e fortificado com B[a]P e Ac). Os valores em negrito indicam $p < 0,05$	24
TABELA 10- Resultados do teste pareado do efeito do pH da PERMANOVA da variável dependente LPO, exposição a 25°C. O teste foi bifatorial, considerando todos os pHs (6.7, 7.1 e 7.5). Os valores em negrito indicam $p < 0,05$	24

TABELA 11- Resultados do teste principal da PERMANOVA da variável dependente LPO, exposição a 27°C. O teste foi bifatorial, considerando todos os pHs (6.7, 7.1 e 7.5) e respectivos tratamentos de HPAs (controle acetona e fortificado com B[a]P e Ac). Os valores em negrito indicam $p < 0,05$25

TABELA 12- Resultados do teste pareado do efeito da interação entre pH e sedimento contaminado por HPAs da PERMANOVA da variável dependente LPO, exposição a 27°C. O teste foi bifatorial, considerando todos os pHs (6.7, 7.1 e 7.5) e respectivos tratamentos de HPAs (controle acetona e fortificado com B[a]P e Ac). Cntrl Acet= Controle acetona. Os valores em negrito indicam $p < 0,05$25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
1.1	Objetivo e hipótese.....	11
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
2.1	Desenho experimental.....	12
2.2	Coleta e fortificação do sedimento.....	13
2.2.1	Coleta e armazenamento do sedimento.....	13
2.2.2	Fortificação do sedimento (<i>sediment spiking</i>).....	14
2.3	Sistema de injeção de CO ₂ , controle de pH e temperatura.....	15
2.4	Exposição dos organismos e análise de biomarcadores.....	16
2.5	Especiação do sistema carbonato da água.....	17
2.6	Análise dos resultados.....	18
3	RESULTADOS	18
4	DISCUSSÃO.....	26
5	CONCLUSÃO.....	28
	REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

Atividades humanas impactam negativamente quase todo o oceano (Halpern et al., 2007) e com as expectativas de um aumento cada vez maior na população, o ambiente marinho continuará sofrendo com os impactos gerados por essa ocupação (Nogales et al., 2010). Atividades de industrialização, desmatamento e queima de combustíveis fósseis, que ocorrem desde a Revolução Industrial, provocam um constante crescimento nas concentrações de dióxido de carbono (CO_2) na atmosfera, levando inclusive a um aumento na temperatura média do planeta (IPCC, 2013).

De fato, já se tem constatado um aumento na temperatura média do meio aquático (IPCC, 2013). A previsão até 2100 é que as águas superficiais marinhas aumentem a temperatura média de 2°C a 5°C (Portner & Knust, 2007). Essa variação tende a provocar, entre outros efeitos, estratificação das massas de água e dificultar a ciclagem de nutrientes e outros compostos como fósforo e ferro (Nogales et al., 2010). O estresse térmico também pode causar danos em nível sub-individual, como modificações nas estruturas das proteínas, incluindo as do DNA, diminuição da capacidade de reparo celular de alguns organismos, alteração das vias metabólicas, deixando de utilizar os estoques de lipídeos para geração de ATP e diminuição da taxa metabólica, devido à depressão da concentração de oxigênio dissolvido na água (Yao et al., 2014). O aumento da temperatura do oceano é considerada uma das maiores ameaças que os ecossistemas marinhos enfrentam (Halpern et al., 2007).

Além disso, o oceano é a principal fonte de sequestro de carbono atmosférico e estima-se que cerca de 48% do CO_2 antropogênico seja absorvido por ele (Sabine et al., 2004). O aumento no nível desse gás dissolvido no meio marinho altera seus parâmetros químicos e pode comprometer a biota. Já são demonstradas reduções nos valores de pH desses ecossistemas e estima-se que em 2100, o oceano apresente valores 0,3 a 0,4 menores que os registrados atualmente (IPCC, 2013). À medida que a concentração de CO_2 aumenta no oceano, alteram-se as razões de espécies de carbono inorgânico dissolvido (H_2CO_3 , HCO_3^- e CO_3^{2-}) já existentes (Murray, 2004). Uma parcela do CO_2 é incorporado pelo fitoplâncton no processo de fotossíntese e outra reage com a água gerando o ácido carbônico (H_2CO_3). Este composto causa o aumento de íons de bicarbonato (HCO_3^{-1}) e íons de hidrogênio (H^+) e a diminuição da concentração de íons carbonato (CO_3^{2-}) (UNEP, 2014). Este último é utilizado juntamente com o Ca^{+2} presente no ambiente para formação de conchas, transformando-se em carbonato de cálcio (CaCO_3). Muitos organismos marinhos são sensíveis às mudanças na química dos carbonatos, o que pode levar a alterações ecológicas nos ecossistemas (Kroeker

et al., 2010). O estado de saturação do carbonato de cálcio é um indicador de acidificação (Ω) e quando se encontra insaturado ($\Omega < 1$) afeta diretamente organismos calcificantes (Gregor & Gruber, 2020; Kikuchi et al., 2021).

Além do aquecimento e acidificação, o oceano sofre com descargas de efluentes que provocam a contaminação dos corpos d'água por poluentes químicos, que também são *drivers* antropogênicos, responsáveis por causar alterações ecológicas significativas (Halpern et al., 2008). Outros impactos humanos, associados a efeitos de mudança climática, são importantes vetores no impacto cumulativo global (Halpern et al., 2008).

A maioria dos contaminantes químicos se deposita nos sedimentos, fazendo com que o meio bentônico funcione como um depósito de substâncias que apresentam riscos à integridade da biota (Petrovic & Barceló, 2004). Os compostos orgânicos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), formados a partir da combustão incompleta de matéria orgânica entre outras fontes como combustíveis fósseis, por exemplo, apresentam uma ameaça ao ambiente marinho, pois são altamente tóxicos. Por serem lipofílicos, tem grande afinidade com o sedimento e persistem nos sistemas biológicos provocando bioacumulação e biomagnificação, podendo atingir os sistemas dos predadores de topo, como os humanos, por exemplo (Islam & Tanaka, 2004). Esses contaminantes estão onipresentes no meio marinho. Os químicos hidrofóbicos podem se acumular nos organismos através da captação direta da água, partículas em suspensão ou consumo de alimentos contaminados (Van der Oost et al., 2003). Além da persistência nos organismos, os HPAs podem apresentar alterações na toxicidade em decorrência da acidificação marinha (Chen et al., 2018), já que o pH pode modificar as características químicas das substâncias dissolvidas na água do mar, tornando-os biodisponíveis para organismos aquáticos (Knutzen, 1981; Feng et al., 2011) e dificultar a degradação desse poluente no ambiente (Zeng et al., 2015).

É esperado que efeitos cumulativos de múltiplos estressores sejam mais drásticos do que efeitos de um único estressor agindo isoladamente (Crain, Kroeker, Halpern, 2008). Entender os efeitos antropogênicos no ecossistema marinho através de uma avaliação de risco ambiental ou ecológico (ERA), considerando efeitos sinérgicos entre poluição química e mudanças climáticas, é fundamental para manter os serviços ecossistêmicos, entendendo a proporção e probabilidades dos efeitos negativos das atividades humanas, com uma abordagem que se aproxima do contexto real. Embora sejam constantemente pesquisados os efeitos na biota frente à exposição de um único estressor (Przeslawski et al., 2015), o estudo dos impactos cumulativos e interativos dos múltiplos estressores é menos frequente. Ainda que os sistemas naturais estejam quase sempre sujeitos a variações nos fatores ambientais

(bióticos e abióticos) (Breitburg et al., 1998), assim como à presença de misturas complexas de contaminantes, os efeitos na biota causados pelo aquecimento, acidificação e contaminação química em decorrência de uma mistura de contaminantes ainda são pouco conhecidos e devem ser avaliados.

Este conhecimento é especialmente importante para avaliação de qualidade ambiental voltada ao habitat bentônico. O sistema bentônico é importante na sua estrutura, abrigo de cerca de 98% das espécies marinhas (Widdicombe et al., 2010), e na sua funcionalidade, pois é principalmente neste ambiente que acontece a decomposição da matéria orgânica e remineralização de nutrientes.

Biomarcadores podem ser respostas bioquímicas e celulares quantificadas nos tecidos dos organismos e que permitem detectar os primeiros sinais de dano causados pelos contaminantes (Stegeman et al., 1992). Essas análises são consideradas adequadas para os estudos de avaliação de qualidade ambiental, pois conectam a biodisponibilidade dos contaminantes - considerando suas concentrações - com a possível toxicidade (Van der Oost et al., 2003). Os biomarcadores são uma boa ferramenta para quantificação dos efeitos deletérios, uma vez que são respostas sensíveis, que detectam sinais prévios de poluição em níveis bioquímico e celular, ao contrário das respostas em nível individual que normalmente só se tornam visíveis após longos períodos de exposição ao contaminante, onde muitas vezes não é possível a conversão ou diminuição de riscos (Van der Oost et al., 2003).

Os biomarcadores podem ser classificados como “de exposição” e “de efeito”. Os biomarcadores de exposição são variações biológicas que podem ser medidas e que apontam a exposição dos organismos aos contaminantes e os biomarcadores de efeito incluem a medição de alterações bioquímicas, fisiológicas, ou de qualquer outro tipo, que ocorrem em tecidos ou fluidos corporais de um organismo, e que estejam claramente associadas a um estresse real ou potencial à saúde do indivíduo (NRC, 1987).

A avaliação dos efeitos causados pelos contaminantes orgânicos em cenários futuros de aquecimento e acidificação dos oceanos realizada neste estudo contemplou a avaliação das respostas de biomarcadores de efeito (LPO e dano em DNA) em dois cenários de exposição. O organismo-teste utilizado foi o bivalve *Mytella charruana* (Mollusca: Mytellidae) popularmente conhecido como “sururu”. Este organismo desempenha um papel ecológico importante no fluxo de energia nos ecossistemas marinhos além de apresentar valor econômico e de subsistência para pescadores artesanais (CEPENE/IBAMA, 2006).

1.1 Objetivo e hipótese

Considerando o déficit de estudos sobre efeitos sinérgicos de aquecimento e acidificação marinha e toxicidade de dois HPAs impactando a biota, o objetivo do estudo apresentado neste documento foi avaliar alterações de toxicidade de HPAs em sedimento, resultado do aquecimento e acidificação do meio marinho, através de respostas de biomarcadores bioquímicos em *Mytella charruana*.

O trabalho teve como hipótese que o aumento da temperatura e a acidificação das águas costeiras modificam a toxicidade e biodisponibilidade de HPAs devido alterações na fisiologia dos organismos e nas interações físico-químicas do contaminante com o meio.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho experimental

Danos em DNA e lipoperoxidação em *M. charruana* foram avaliados considerando a manipulação de três fatores: (i) contaminação do sedimento, (ii) aquecimento e (iii) acidificação do meio marinho. Os fatores (ii) e (iii) equivalem o contexto presumido para o ano de 2100, conforme o relatório do IPCC (IPCC, 2013). Sendo assim, dois níveis de temperaturas (T°C) foram testados: 25°C e 27°C, referente à diferença de +2°C projetado para 2100 pelo IPCC; três níveis de pH: 7.5, controle representando o cenário encontrado atualmente, e 7.1 e 6.7, variação de -0.4 desenhado pelo IPCC em um cenário futuro. Por fim, o fator contaminação por HPAs contou com dois níveis de variação, nomeados: “Controle Acetona” e “HPAs”. Durante todo o experimento foi injetado CO₂ gasoso puro, de forma controlada, na água onde os organismos foram expostos para realizar a acidificação. A figura 1 apresenta esquematicamente o desenho experimental do estudo.

O sedimento foi contaminado através da fortificação (*spiking*) de um sedimento puro com dois HPAs misturados, Benzo[a]Pireno e Acenafteno, que estão presentes na lista dos 16 HPAs prioritários da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) e se encontram em sedimentos por toda a extensão costeira de São Paulo (CETESB, 2008) e também em altas concentrações no Sistema Estuarino de Santos (Torres et al., 2015). Ademais, estes análogos possuem coeficientes de partição octanol-água diferentes (log K_{ow} = 6,13 e 3,92 respectivamente), o que influenciam na sua ligação ao sedimento e poderiam, então, mostrar resultados divergentes de remobilização nos contextos que foram testados. O estudo dos efeitos específicos referentes à exposição seletiva desta ordem de poluentes foi possível utilizando o método de fortificação dos sedimentos em laboratório ao invés dos

sedimentos coletados no campo, em áreas com conhecida contaminação por HPAs, permitindo a diminuição da interposição de outros contaminantes que poderiam se encontrar ocultos nas amostras.

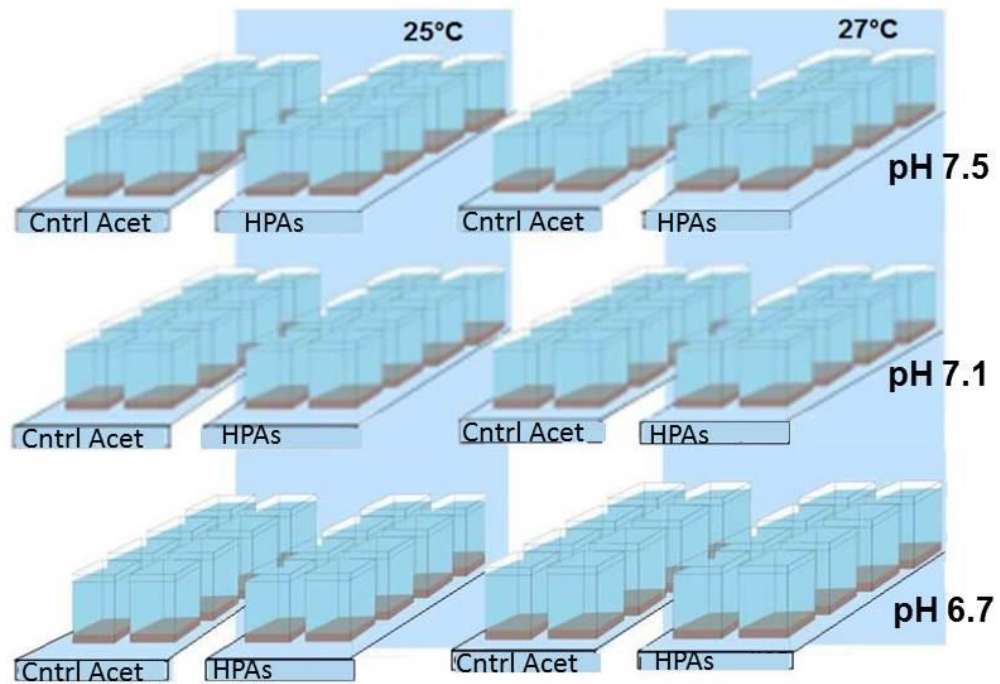


Figura 1. Desenho experimental mostrando os níveis de variação de cada um dos três fatores testados.

2.2 Coleta e fortificação do sedimento

2.2.1 Coleta e armazenamento do sedimento

Todos os ensaios receberam sedimentos que foram coletados em local livre de contaminação, precisamente na foz do rio Itaguaré ($-23,763^{\circ}$ S e $-45,773^{\circ}$ O), localizada no município de Bertioga (SP) (figura 2).

O transporte dos sedimentos coletados foi realizado em recipientes plásticos até o local de armazenamento no laboratório, onde ficaram ao abrigo de luz e sob temperatura ininterrupta de 4°C .

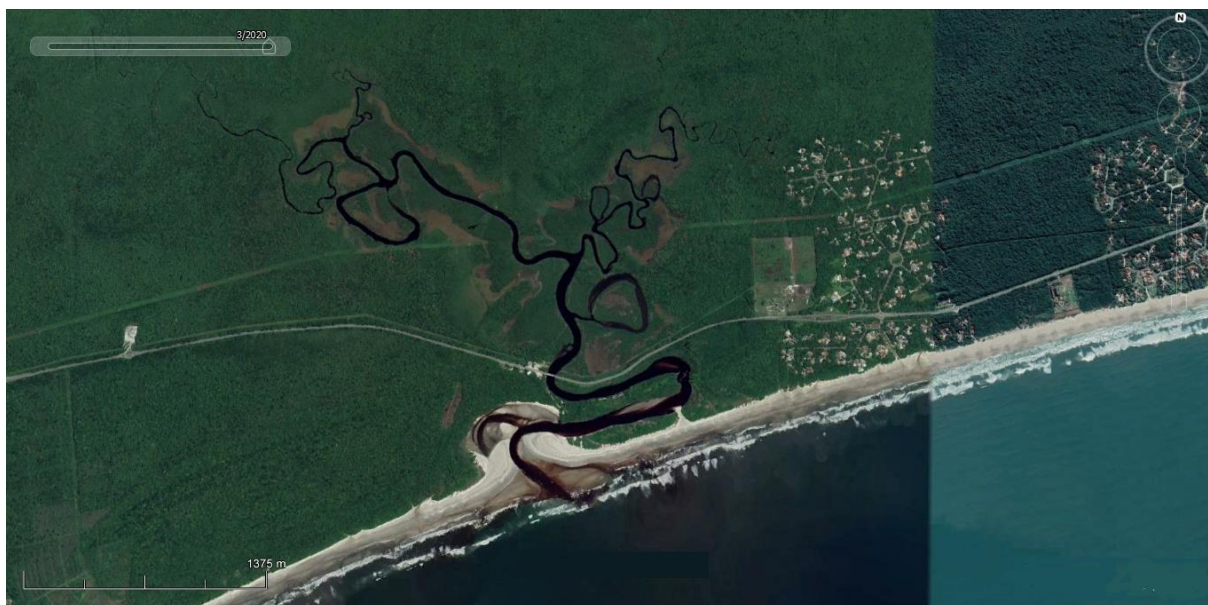


Figura 2. Foz do rio Itaguapé, Bertioga (SP). Imagem de satélite obtida pelo software Google Earth Pro.

2.2.2 Fortificação do sedimento (*sediment spiking*)

Para que pudesse se obter um produto homogêneo, o sedimento coletado foi misturado com auxílio de misturador elétrico de argamassa. Os HPAs possuem baixa solubilidade em água, portanto para que pudesse ser feita a fortificação dos sedimentos, foi adicionado um solvente orgânico como co-solvente ao sedimento (ASTM, 2014). Uma solução estoque composta pela dissolução dos contaminantes de interesse (grau de reagente) no co-solvente representou a fortificação. A acetona, por possuir baixa toxicidade e alta volatilidade (ASTM, 2014), foi utilizada como solvente orgânico. As concentrações nominais dos contaminantes testados se encontram na tabela 1.

A solução de HPAs foi incorporada ao sedimento úmido, que então foi homogeneizado com auxílio de misturador elétrico durante 30 minutos. O sedimento repousou por 7 dias, abrigado de luz e sob resfriamento constante de 4°C, para que se atingisse um equilíbrio químico entre as substâncias adicionadas e o sedimento¹ (ASTM, 2014).

Tabela 1. Concentrações nominais das substâncias fortificadas nos sedimentos-teste.

¹ Ainda que ASTM (2014) recomende tempos de exposição mais longos para substâncias com alta hidrofobicidade, como os HPAs e Irgarol, é preciso avaliar o compromisso entre o tempo de equilíbrio e a degradação da substância.

Substância	Concentração Nominal	Unidade
Acenafeno	68,4	$\mu\text{g kg}^{-1}$
Benzo[a]pireno	594,5	$\mu\text{g kg}^{-1}$

As concentrações dos contaminantes testados foram consideradas intermediárias, determinadas entre valores-guias de qualidade de sedimento do *Threshold Effects Level* (TEL) e *Probable Effects Level* (PEL) (CCME, 2002). Os valores determinados podem causar alterações nas respostas dos biomarcadores, pois são concentrações relevantes no ambiente, podendo gerar alterações nas respostas de biomarcadores nos tratamentos controle e possibilitando a comparação com as modificações nos demais tratamentos.

2.3 Sistema de injeção de CO₂, controle de pH e temperatura

Válvulas selenóides dispostas em série ligadas a uma fonte automática injetora de CO₂, que controla a entrada do gás em cada um dos tratamentos do sistema-teste de maneira independente, e a um computador com o software de controle AquaMedic, que determina, através de sensores, o pH de cada unidade do sistema de exposição e portanto realiza um monitoramento constante do pH da água do mar durante o período de exposições, formam o sistema de injeção de CO₂ e controle de pH.

O sistema libera automaticamente CO₂ em concentrações suficientes para restabelecer o valor de pH nos tratamentos quando detectado um valor 0.01 superior ao estabelecido, durante todo o tempo de exposição.

O modelo de caixa parcialmente fechada foi utilizado neste estudo, consistindo na infusão de CO₂ de maneira indireta nos meios de exposição. Neste modelo, uma caixa fechada com pequenas aberturas que permitem renovação do ar interior, acomodou dois recipientes idênticos aos recipientes utilizados nas exposições dos organismos-teste, contendo a mesma proporção de água de diluição e sedimento, além das unidades experimentais. Um dos recipientes sem organismos recebeu o sensor de pH, enquanto que no outro, o CO₂ foi borbulhado pelo sistema de injeção indireta. Assim, tanto o recipiente com o sensor de pH quanto os recipientes de exposição receberam de maneira similar o CO₂ borbulhado no primeiro béquer.

Os ensaios foram realizados em sala climatizada, mantendo a temperatura ambiental constante através de um sistema de condicionador com função reversa (quente/frio), devido ao grande número de sistemas-teste operando ao mesmo tempo, além do sistema de banho maria

das caixas, onde foram utilizados termostatos que garantiram assim a homogeneidade da temperatura de exposição em todos os tratamentos até o momento de finalização do teste.

2.4 Exposição dos organismos e análise de biomarcadores

Mytella charruana são organismos eurihalinos, bentônicos e devido ao seu modo de alimentação (suspensívoro filtrador), estão expostos à contaminação do sedimento tanto via água como via alimentação. Além disso, por se enterrarem no substrato, também podem estar expostos no contato direto com o sedimento. Foram avaliados efeitos tóxicos consequentes à exposição de HPAs através da quantificação do dano em DNA (genotoxicidade) e da ativação de mudanças nos níveis de LPO (dano em membranas).

A coleta dos organismos ocorreu nos manguezais que se localizam nas margens do canal de Bertioga (SP) onde se encontram em abundância. Em laboratório, os animais foram separados em três grupos distintos, mas de tamanhos homogêneos dos indivíduos, e mantidos sob aeração constante em tanques diferentes com água do mar cujo pH foi mantido ou sendo lentamente (0.5 unidade/dia) diminuído até o pH de exposição, durante 3 dias, para aclimação às condições de laboratório e aos respectivos valores de pH aos quais os organismos seriam expostos em seguida. Os sistemas de exposição constituíram-se de aquários de 15L onde se adicionaram 12L de água do mar de diluição² e 3L de sedimento (razão 1:4 sedimento/água). Cada tratamento e controle era formado por 3 réplicas com 12 organismos adultos que foram dispostos em cada recipiente de exposição e mantidos sob aeração constante durante 96h. Após 48h do início da exposição foi fornecida alimentação uma vez. No início e no fim do tempo de exposição, foram realizadas análises físico-químicas de controle de qualidade do ensaio (i.e. pH, OD., salinidade e concentração de amônia não-ionizada).

Foram coletadas as brânquias dos animais imediatamente após a eutanásia, ao final da exposição e mantidas em um ultrafreezer (-80°C) até o início das análises de biomarcadores. A homogeneização dos tecidos foi feita através de gelo com tampão Tris-HCl (Tris 50mM; EDTA 1mM; DTT 1mM; Sucrose 50mM; KCl a 150mM, PMSF 1mM, pH 7,6) a 4% massa:volume. Para quantificação de dano em DNA e LPO, os homogenatos das brânquias foram armazenados.

A avaliação dos danos em DNA foi feita utilizando o método da precipitação alcalina

² O termo “água de diluição” refere-se à água do mar não contaminada, filtrada em membrana de 0,45µm e salinidade 30 onde quer que apareça ao longo do texto.

(Gagné & Blaise, 1995), fundamentado na precipitação do DNA genômico ligado a proteínas, as quebras simples da cadeia de DNA-proteína ficam livres no sobrenadante. Inicialmente as amostras homogeneizadas foram colocadas em um tubo de microcentrífuga (25µl) e lisadas em detergente dodecil sulfato de sódio (2%) seguido de adição de cloreto de potássio (0,12M), após esta etapa as amostras foram aquecidas (10 minutos em 60°C) e então resfriadas (30 minutos em 4°C). Após este processo as amostras foram centrifugadas a baixa velocidade (5 minutos a 8000g) para disponibilização do sobrenadante. Os filamentos sobrenadantes de DNA foram dimensionados através da fluorescência (λ_{ex} 360nm e 450nm λ_{em}) após coloração com corante *Hoescht*. A calibração foi feita com uso de soluções padrão de DNA de espermatozoide de salmão.

Para avaliação dos níveis de LPO, foi quantificado o malondialdeído (MDA), um dos produtos finais formados através da decomposição de determinados produtos de peroxidação lipídica que possui baixo peso molecular. Foi empregado o método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) (Wills, 1987). Tal método analisa os produtos finais da peroxidação lipídica da amostra homogeneizada (150µl) que ao reagir com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) após a acidificação (ácido tricloro acético 10% em $FeSO_4$ 1mM) e o aquecimento (10 minutos a 70°C) possibilita a formação das bases de Schiff. Estes complexos são coloridos (rosa) e sua concentração é determinada através de fluorescência (λ_{ex} 532nm e λ_{em} 556nm). Os resultados são calculados utilizando uma curva padrão com concentrações conhecidas de tetrametoxipropano.

As leituras da fluorescência e absorbância foram realizadas em leitor de microplacas. As concentrações de proteína determinadas por espectrofotometria a 595nm (Bradford, 1976) utilizando BSA (proteína albumina do soro bovino) como padrão para normalizar todas as análises.

2.5 Especiação do sistema carbonato da água

O balanço do sistema carbonato (i.e. concentrações de alcalinidade total, carbono inorgânico total, HCO_3^- , CO_3^{2-} , CO_2 , pCO_2 , saturação (Ω) de argonita, (Ω) calcita) pode ser alterado pela acidificação da água do mar. Assim, a especiação do sistema carbonato foi caracterizada, tanto nos tratamentos contaminados quanto nos controles de contaminação. Após o tempo de exposição, a alcalinidade total foi medida na água, através da técnica de titulação com HCl(0,1M) e auxílio de titulador automático (Hanna HI 901). A especiação do sistema carbonato foi estimada utilizando os dados provenientes das análises de pH e

alcalinidade total, através do programa CO2SYS (Pierrot et al., 2006), com constante dissociação de Mehbach et al 1973, adaptado por Dickson e Millero 1987 e com escala de pH NBS ($\text{mol kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$).

2.6 Análise dos resultados

Foram plotados gráficos com base nos dados obtidos nos experimentos, utilizando o programa GraphPad Prism 5. As séries de dados foram avaliadas quanto à homocedasticidade (p. ex.: teste de Levene). O efeito dos fatores temperatura, pH, contaminação, e suas interações sobre as respostas individuais de danos em DNA ou LPO foram avaliados através da análise de variância por permutações (PERMANOVA) bifatorial, nas duas temperaturas independentemente, utilizando o software PRIMER.

Foram adotadas distâncias Euclidianas nas matrizes de similaridade no teste da PERMANOVA, dispostas em desenhos bifatoriais (fator pH e fator contaminação) obtidos nas duas temperaturas testadas. Foram realizados testes principais (*main test*) e quando detectadas diferenças significativas ($p > 0,05$), para localizá-las, testes pareados (*pairwise*) com permutação de Monte Carlo foram realizados.

Para confirmação dos resultados obtidos nas análises da PERMANOVA, foram feitos testes do PERMIDSP, que avaliaram a homogeneidade da dispersão dos dados obtidos das respostas dos biomarcadores, também utilizando o software PRIMER.

3 RESULTADOS

Os resultados físico-químicos iniciais e finais, obtidos através das medições feitas na água onde os organismos foram expostos estão apresentados na tabela 2. As variações de salinidade e oxigênio dissolvido (OD) não são significativas para interferir nas respostas obtidas. As variações dos valores de pH dentro de cada tratamento não se mostraram altas, validando a qualidade e eficácia do método empregado.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos de controle de qualidade dos ensaios. Cntrl Sed= Controle sedimento; Cntrl Acet = Controle co-solvente acetona; HPAs= sedimento fortificado com a mistura de Benzo[a]pireno e Acenafteno; Cntrl Temp= Controle temperatura.

Exposição	Inicial/Final	Tratamento	Salinidade	OD (ppm)	pH	T°C
25°C	Inicial	-	27	6.21	8	25
	Final	Cntrl Sed 6.7	26 ± 0	3.437 ± 0.86	7.017 ± 0.175	25
		Cntrl Sed 7.1	26 ± 0	3.777 ± 0.32	7.21 ± 0.103	25
		Cntrl Sed 7.5	25 ± 0	4.1 ± 0.26	7.805 ± 0.058	25
		Cntrl Acet 6.7	25.75 ± 0.43	4.1 ± 0.59	6.73 ± 0.11	25
		Cntrl Acet 7.1	26 ± 0	3.905 ± 0.13	7.032 ± 0.035	25
		Cntrl Acet 7.5	26 ± 0	3.927 ± 0.30	7.385 ± 0.18	25
		HPAs 6.7	26 ± 0	4.295 ± 0.58	6.807 ± 0.43	25
		HPAs 7.1	26 ± 0	3.465 ± 1.03	7.422 ± 0.196	25
		HPAs 7.5	26 ± 0	4.325 ± 0.39	7.822 ± 0.1	25
27°C	Inicial	-	27	7.3	8.13	27
	Final	Cntrl Sed 6.7	29 ± 0.7	3.79 ± 0.38	6.432 ± 0.06	27
		Cntrl Sed 7.1	28 ± 1.22	5.35 ± 0.09	6.927 ± 0.13	27
		Cntrl Sed 7.5	27.25 ± 1.09	5.337 ± 0.07	7.24 ± 0.1	27
		Cntrl Acet 6.7	27.5 ± 1.12	3.272 ± 0.1	6.72 ± 0.07	27
		Cntrl Acet 7.1	28.25 ± 0.43	4.045 ± 0.52	6.88 ± 0.09	27
		Cntrl Acet 7.5	28.75 ± 0.83	3.342 ± 0.71	7.212 ± 0.24	27
		HPAs 6.7	26.5 ± 1.12	3.445 ± 0.06	6.847 ± 0.075	27
		HPAs 7.1	26.75 ± 0.83	2.847 ± 0.45	7.025 ± 0.096	27
		HPAs 7.5	27.5 ± 0.5	3.092 ± 0.13	7.16 ± 0.13	27
		Cntrl Temp	27.25 ± 0.43	3.552 ± 0.5	7.26 ± 0.01	25

Os valores do sistema carbonato na água dos experimentos, considerando todos os tratamentos (Sedimento controle, controle acetona e contaminado com HPA) em todos os pHs (7.5, 7.1 e 6.7) e em todas as temperaturas testadas (25°C e 27°C) estão exibidos nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Composição de espécies carbonáticas e alcalinidade total nas amostras de água dos tratamentos para temperatura 25°C.

	pCO ₂ (µatm)	HCO ₃ (µmol/kgSW)	CO ₃ (µmol/kgSW)	CO ₂ (µmol/kgSW)	B Alk (µmol/kgSW)	OH (µmol/kgSW)	ΩCa	ΩAr
Cntrl Sed pH 6.7	1541,8	1879,4	16,0	101,9	8,5	0,1	0,40	0,24
Cntrl Sed pH 7.1	678,4	1619,5	27,0	44,8	16,3	0,2	0,67	0,41
Cntrl Sed pH 7.5	126,0	1321,3	94,9	8,4	58,0	1,0	2,37	1,44
Cntrl Acet pH 6.7	3901,0	2061,2	7,6	258,1	3,7	0,0	0,19	0,12
Cntrl Acet pH 7.1	1389,0	1865,5	17,5	91,8	9,4	0,1	0,44	0,27
Cntrl Acet pH 7.5	482,8	1648,2	39,3	31,9	22,8	0,3	0,98	0,60
HPAs pH 6.7	1550,5	1162,5	6,1	102,4	5,3	0,1	0,15	0,09
HPAs pH 7.1	864,9	1652,5	22,1	57,1	13,2	0,2	0,55	0,34
HPAs pH 7.5	196,9	1437,6	73,4	13,0	45,0	0,7	1,83	1,12

Tabela 4. Composição de espécies carbonáticas e alcalinidade total nas amostras de água dos tratamentos para temperatura 27°C.

	pCO ₂ (µatm)	HCO ₃ (µmol/kgSW)	CO ₃ (µmol/kgSW)	CO ₂ (µmol/kgSW)	B Alk (µmol/kgSW)	OH (µmol/kgSW)	ΩCa	ΩAr
Cntrl Sed pH 6.7	4463,4	2710,6	12,3	289,6	4,9	0,1	0,30	0,19
Cntrl Sed pH 7.1	856,4	1808,3	27,8	55,9	15,9	0,2	0,69	0,42
Cntrl Sed pH 7.5	2583,0	1552,1	6,7	169,4	4,5	0,1	0,17	0,10
Cntrl Acet pH 6.7	1413,4	1720,6	15,1	92,5	9,1	0,1	0,37	0,23
Cntrl Acet pH 7.1	962,9	1655,0	20,8	62,8	13,2	0,2	0,52	0,32
Cntrl Acet pH 7.5	321,8	1458,3	48,9	20,9	33,4	0,4	1,21	0,75
HPAs pH 6.7	1247,7	1668,8	15,8	82,2	9,6	0,1	0,39	0,24
HPAs pH 7.1	968,5	1581,5	18,3	63,7	11,7	0,2	0,46	0,28
HPAs pH 7.5	456,1	1423,2	32,0	29,9	22,5	0,3	0,79	0,49

As saturações e calcita e argonita seguiram um padrão decrescente que acompanha a acidificação do meio nas amostras a 25°C, mas não apresentam um comportamento padrão

nas amostras a 27°C. Também foi possível observar um aumento da pressão parcial de CO₂ a 27°C quando comparado aos tratamentos de 25°C, especialmente nos valores de controle sedimento no pH 6.7.

Os resultados de respostas dos biomarcadores em brânquias de *M. Charruana* expostas a mistura de HPAs em três níveis de pH e dois níveis de temperatura, bem como seus tratamentos controle, estão apresentados nas Figuras 3 e 4. Efeitos significativos dos fatores testados e suas interações sobre cada resposta de biomarcador foram avaliados individualmente em cada temperatura testada.

O pH é o fator que exerce maior influência na produção das respostas observadas dos danos em DNA (figura 3) e LPO (figura 4), apresentando efeitos interativos ou não, nas diferentes temperaturas testadas. Para o dano em DNA, existe uma tendência geral de diminuição do efeito em acidificação a 25°C, enquanto que a 27°C a tendência observada é a intensificação do efeito nos organismos em ambiente acidificado (figura 3a). Porém, enquanto a 25°C o pH apresenta um efeito isolado de diminuição do dano em DNA nos pHs acidificados em relação ao controle, nos tratamentos com temperatura de 27°C foram observados efeitos interativos entre pH e contaminação por HPAs (tabela 7). Na temperatura mais alta, há uma diminuição significativa do dano em DNA apenas no pH 6.7, sendo que nos demais pHs não há efeito dos contaminantes (tabela 8).

Tabela 5. Resultados do teste principal da PERMANOVA da variável dependente danos em DNA, exposição a 25°C. O teste foi bifatorial, considerando todos os pHs (6.7, 7.1 e 7.5) e respectivos tratamentos de HPAs (controle acetona e fortificado com B[a]P e Ac). Os valores em negrito indicam $p < 0,05$.

Fator	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
pH	3	3818	1272,7	10,618	0,001
Contaminação	1	4,5214E-2	4,5214E-2	3,7723E-4	0,979
pH x Contaminação	3	42,081	14,027	0,11703	0,943

Tabela 6. Resultados do teste pareado do efeito do pH da PERMANOVA da variável dependente danos em DNA, exposição a 25°C. O teste foi bifatorial, considerando todos os pHs (6.7, 7.1 e 7.5). Os valores em negrito indicam $p < 0,05$.

pH	t	P(perm)	perms	P(MC)
7.5 x 7.1	5,2167	0,001	999	0,001
7.5 x 6.7	3,5668	0,001	995	0,002
7.1 x 6.7	1,2148	0,248	997	0,225

Tabela 7. Resultados do teste principal da PERMANOVA da variável dependente danos em DNA, exposição a 27°C. O teste foi bifatorial, considerando todos os pHs (6.7, 7.1 e 7.5) e respectivos tratamentos de HPAs (controle acetona e fortificado com B[a]P e Ac). Os valores em negrito indicam $p < 0,05$.

Fator	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
pH	2	997,46	498,73	4,9267	0,022
Contaminação	1	83,782	83,782	0,82764	0,357
pH x Contaminação	2	788,02	394,01	3,8922	0,027

Tabela 8. Resultados do teste pareado do efeito da interação entre pH e sedimento contaminado por HPAs da PERMANOVA da variável dependente danos em DNA, exposição a 27°C. O teste foi bifatorial, considerando todos os pHs (6.7, 7.1 e 7.5) e respectivos tratamentos de HPAs (controle acetona e fortificado com B[a]P e Ac). Cntrl Acet= Controle acetona. Os valores em negrito indicam $p < 0,05$.

pH x Contaminação	t	P(perm)	perms	P(MC)
(Cntrl Acet x HPA) x 7.5	0,67041	0,508	926	0,543
(Cntrl Acet x HPA) x 7.1	0,59128	0,559	933	0,564
(Cntrl Acet x HPA) x 6.7	2,6744	0,023	918	0,021

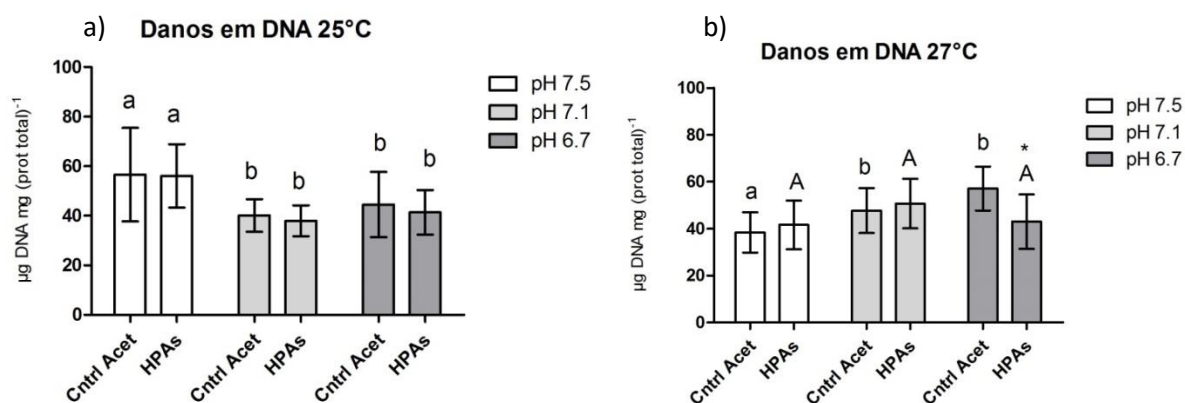


Figura 3. Níveis de danos em DNA. Média e desvio padrão (n=8) dos resultados de biomarcadores a HPAs e controle acetona em três níveis de pH (6.7, 7.1 e 7.5) e dois níveis de temperatura (25°C e 27°C). Asteriscos

representam diferença significativa do tratamento HPA em relação ao controle acetona, dentro de cada nível de pH. Diferenças significativas entre os níveis de pH são representadas por letras diferentes, sendo que as letras em caixa baixa representam comparações entre níveis de pH dentro do tratamento controle acetona e letras em caixa alta representam comparações entre níveis de pH dentro do tratamento de exposição a HPAs. Gráfico obtido utilizando o software GraphPad Prism 5.

Os resultados de peroxidação lipídica nas análises a 25°C do teste principal PERMANOVA demonstram diferenças significativas do pH como fator isolado (tabela 9). Os testes pareados identificaram um aumento significativo da LPO no tratamento de pH 6.7 em comparação com o tratamento de pH 7.1 (tabela 10).

Tabela 9. Resultados do teste principal da PERMANOVA da variável dependente LPO, exposição a 25°C. O teste foi bifatorial, considerando todos os pHs (6.7, 7.1 e 7.5) e respectivos tratamentos de HPAs (controle acetona e fortificado com B[a]P e Ac). Os valores em negrito indicam $p < 0,05$.

Fator	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
pH	2	33,345	16,672	3,4291	0,034
Contaminação	2	9,1478	4,5739	0,94073	0,337
Ph x Contaminação	2	16,405	8,2023	1,687	0,202

Tabela 10. Resultados do teste pareado do efeito do pH da PERMANOVA da variável dependente LPO, exposição a 25°C. O teste foi bifatorial, considerando todos os pHs (6.7, 7.1 e 7.5). Os valores em negrito indicam $p < 0,05$.

pH	t	P(perm)	perms	P(MC)
7.5 x 7.1	0,11233	0,91	998	0,918
7.5 x 6.7	1,9584	0,058	995	0,057
7.1 x 6.7	2,1658	0,045	998	0,047

Já nas análises de LPO a 27°C, o teste principal da PERMANOVA identificou efeitos significativos da interação do pH e contaminação (tabela 11). Os testes pareados para o termo da interação entre pH e HPAs demonstraram diferenças importantes de LPO entre controle acetona e HPAs tanto no pH 6.7 quanto no pH 7.1 (embora apenas o primeiro mostrou

$p < 0,05$) (tabela 12), demonstrando um aumento dos efeitos de peroxidação lipídica no tratamento HPAs com pH 7.1, mas uma diminuição da LPO no tratamento contaminado no pH mais ácido (figura 4b).

Tabela 11. Resultados do teste principal da PERMANOVA da variável dependente LPO, exposição a 27°C. O teste foi bifatorial, considerando todos os pHs (6.7, 7.1 e 7.5) e respectivos tratamentos de HPAs (controle acetona e fortificado com B[a]P e Ac). Os valores em negrito indicam $p < 0,05$.

Fator	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)
pH	2	43,523	21,762	7,2322	0,001
Contaminação	1	0,34163	0,34163	0,11354	0,732
pH x Contaminação	2	37,254	18,627	6,1905	0,004

Tabela 12. Resultados do teste pareado do efeito da interação entre pH e sedimento contaminado por HPAs da PERMANOVA da variável dependente LPO, exposição a 27°C. O teste foi bifatorial, considerando todos os pHs (6.7, 7.1 e 7.5) e respectivos tratamentos de HPAs (controle acetona e fortificado com B[a]P e Ac). Cntrl Acet= Controle acetona. Os valores em negrito indicam $p < 0,05$.

pH x Contaminação	t	P(perm)	perms	P(MC)
(Cntrl Acet x HPA) x 7.5	8,1865E-2	0,928	961	0,939
(Cntrl Acet x HPA) x 7.1	2,009	0,061	928	0,064
(Cntrl Acet x HPA) x 6.7	2,4482	0,032	935	0,025

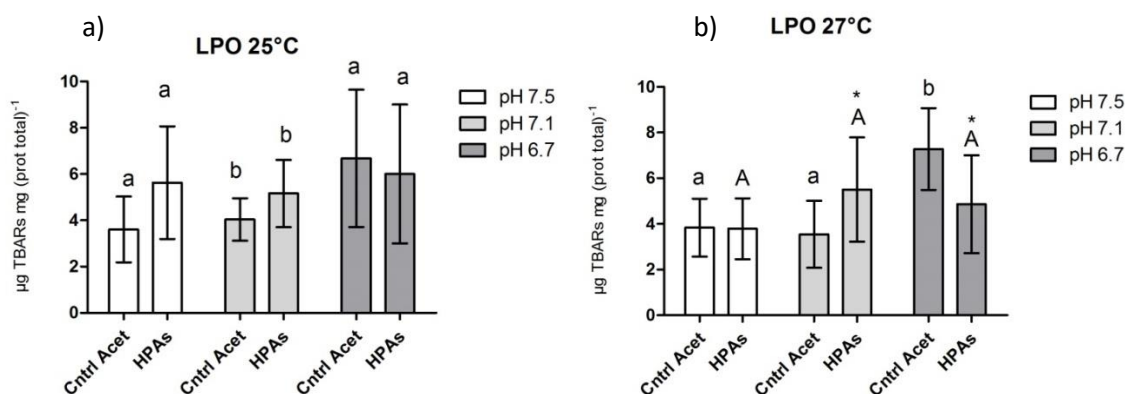


Figura 4. Níveis de LPO. Média e desvio padrão (n=8) dos resultados de biomarcadores a HPAs e controle acetona em três níveis de pH (6.7, 7.1 e 7.5) e dois níveis de temperatura (25°C e 27°C). Asteriscos representam diferença significativa do tratamento HPA em relação ao controle acetona, dentro de cada nível de pH. Diferenças significativas entre os níveis de pH são representadas por letras diferentes, sendo que as

letras em caixa baixa representam comparações entre níveis de pH dentro do tratamento controle acetona e letras em caixa alta representam comparações entre níveis de pH dentro do tratamento de exposição a HPAs. Gráfico obtido utilizando o software GraphPad Prism 5.

As análises de PERMIDISP não indicaram diferenças significativas em nenhum dos tratamentos, confirmando que os efeitos resultantes do experimento são derivados apenas das condições que foram testadas, sem relação com a dispersão dos dados.

4 DISCUSSÃO

Os resultados de danos em DNA e LPO nas duas temperaturas (25°C e 27°C) e nos três níveis de pH (7.5, 7.1 e 6.7) demonstraram alguns padrões. Não houve diferenças significativas nas respostas em nenhum dos tratamentos entre controle acetona e contaminado com HPAs em temperatura controle (25°C). Já na temperatura mais alta (27°C) foi possível observar um padrão crescente de dano em DNA e LPO, no sedimento controle, acompanhando a acidificação do pH. No entanto, efeitos interativos entre pH e contaminação mostraram que no sistema com sedimentos fortificados com HPAs não houve efeito significativo do pH.

A observação do efeito da temperatura comprometendo os mecanismos que lidam com o equilíbrio iônico ou respostas antioxidantes, resultando em maiores danos em DNA e lipoperoxidação em organismos expostos a um cenário de aquecimento marinho é inédita. Isso indica que o estresse causado pela acidificação pode ser compensado em temperaturas de 25°C, mas em 27°C os mecanismos de defesa à acidose podem estar comprometidos.

Uma diminuição significativa nas respostas de danos em DNA e LPO no tratamento contaminado com HPAs em relação ao tratamento controle acetona no pH mais ácido testado (6.7) na temperatura mais alta é outro padrão notado. Este acontecimento pode ser uma resposta do mecanismo de defesa do organismo às condições mais estressantes, podendo ter ativado seu mecanismo de compensação, diminuindo os efeitos e até melhorando sua saúde (supercompensação) (Calabrese, 2010). A qualidade da matéria orgânica associada ao sedimento disponível para os indivíduos testados pode ainda ter sofrido modificações através do potencial da acidificação oceânica de alterar a dinâmica biogeoquímica do carbono orgânico (Kroeker et al., 2011), podendo afetar a biodisponibilidade dos HPAs.

Convencionalmente, o pH não é considerado um parâmetro ambiental relevante na

distribuição e, portanto, aptidão ecológica de bivalves estuarinos (Knezovich, 1994) em comparação com outros fatores como salinidade, composição do sedimento, temperatura, fluxo de água e poluentes químicos (McKeon et al., 2015). No entanto, estudos têm mostrado efeitos significativos no pH sobre bivalves bentônicos em diferentes níveis de organização biológica, desde o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em situações de moderada acidose intracelular (Haider et al., 2016), passando pela redução da sobrevivência de larvas em ambientes acidificados (Gobler et al., 2014), redução do crescimento somático em situações de pH reduzido a partir de 0.3 unidade (Ringwood & Keppler, 2002), até na estruturação da assembleia de bivalves bentônicos estuarinos (em conjunto com salinidade da água de fundo) (McKeon et al., 2015).

A região de coleta do sedimento e dos organismos é caracterizada por ser uma baixada litorânea, morfologia que favorece uma constante mudança na camada superficial do sedimento, decorrente dos processos de retirada e acúmulo (Tricart, 1977). A composição mineralógica sedimentar tem grande influência na parte física e química do meio, interferindo diretamente nos fatores abióticos como, por exemplo, alteração dos valores de pH decorrentes dos ciclos de reciclagem dos compostos associados ao sedimento (EMPRAPA, 1999). A dinâmica de marés e pluviosidade também provocam oscilações do conteúdo associado diretamente ao sedimento como alteração da matéria orgânica, salinidade e pH (Rossi et al., 2002). O pH pode ainda ser modificado pela condição redox do ambiente (Ferreira et al., 2010).

É importante observar o efeito significativo estatisticamente, ainda que discreto, provocado nos organismos pela acidificação como fator isolado. O estresse oxidativo é induzido diretamente pela acidificação ambiental em diferentes espécies, como o peixe-zebra (Tiedke et al., 2013) ou o mexilhão da espécie *Mytilus coruscus* (Huang et al., 2018). É possível que tenha ocorrido um gasto extra para evitar a dissolução das conchas, já que os organismos utilizados nos testes são calcificadores, em contato com pHs mais ácidos (7.1 e 6.7) afetando negativamente de forma direta as demais funções fisiológicas (Melzner et al., 2011).

A alteração da concentração de íons carbonato causada pela acidificação do meio marinho pode não afetar alguns organismos, devido a capacidade de regulação do pH interno derivado da atividade de Ca-ATPase, que realiza a troca ativa de íons de hidrogênio e cálcio (McCulloch et al., 2012). Essa enzima participa do processo de calcificação e ao retirar íons de hidrogênio, mantendo o pH interno alcalino melhorando a eficiência desse sistema (Zebral et al., 2019). Alguns estudos tem demonstrado um crescimento na concentração de íons Ca em

bivalves decorrente do aumento da transcrição e atividade da Ca-ATPase em situações de exposição a xenobióticos (Meng et al., 2018). Essa alteração no metabolismo do organismo causa a diminuição significativa da concentração dos contaminantes, incluindo aqueles responsáveis pelo aumento do estresse oxidativo (Carroll & Romanek, 2008).

Organismos aquáticos, incluindo bivalves bentônicos, podem sofrer estresse oxidativo induzido por potenciais substâncias presentes no ambiente marinho. Embora a poluição aquática possa causar esse estresse oxidativo, esse processo ocorre mesmo na ausência de xenobióticos, numa constante produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos sistemas vivos (Wilhelm Filho et al., 2001). EROs são radicais de oxigênio que apresentam um ou mais elétrons livres (Lima & Abdalla, 2001) e apesar de importantes processos biológicos de sinalização celular (Cordeiro, 2013), quando produzidos em grandes quantidades podem causar danos oxidativos nos tecidos, devido ao desequilíbrio entre pró-oxidante e antioxidante (Lackner, 1998).

O dano em DNA pode estar relacionado diretamente com o estresse oxidativo, já que pode ser lesionado por EROS produzidas por agentes químicos, causando quebras de fita, modificações de bases e ligações cruzadas. As quebras de fita podem ser ocasionadas diretamente por xenobióticos, através da interação com radicais de oxigênio ou outros reativos intermediários (Lee et al., 2003). A peroxidação lipídica, analisada a partir da quantificação de um subproduto da oxidação lipídica (i.e malondialdeído), se mostra importante indicativo não enzimático para o estresse oxidativo. A reação entre um radical livre e um ácido graxo insaturado inicia a oxidação de lipídeos, formando radicais peroxilas durante a sua propagação (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Os HPAs podem causar estresse oxidativo e dano em DNA de forma direta, já que podem ser alterados metabolicamente aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (Jeng et al., 2011) e aumentando a genotoxicidade, podendo causar propagação de mutações nos genes (Martins et al., 2013). Também podem afetar a fisiologia dos organismos de forma indireta, causando um decréscimo do mecanismo de defesa antioxidante (Martins et al., 2013). Alguns estudos demonstram que o estresse oxidativo induz um aumento de produtos da peroxidação lipídica e esta pode provocar alterações nas respostas de toxicidade dos HPAs (Zhigacheva et al., 2002). Como as brânquias são os órgãos principais na entrada de tóxicos no metabolismo do organismo, espera-se que os mecanismos antioxidantes sejam mais rápidos e eficientes nestas localidades, diminuindo os efeitos de peroxidação lipídica (Regoli & Principato, 1995). Portanto, é esperado uma resposta de supercompensação nestes órgãos mesmo em exposição a concentrações baixas ou intermediárias de HPAs (Mattson, 2008).

Os resultados de danos em DNA e LPO não demonstram padrões referentes ao aumento de efeitos deletérios provocados pelos contaminantes testados (Benzo[a]pireno e Acenafteno) em nenhuma condição testada, sugerindo que as concentrações utilizadas, pouco acima do *Threshold Effect Level* (TEL) (CCME, 2002), não provocam danos em DNA nem peroxidação lipídica em *M. Charruana*, mesmo em cenários com múltiplos estressores. É possível que, neste caso, os mecanismos de defesa dos organismos tenham sido capazes de combater os efeitos mais deletérios, sabendo que xenobióticos, como os HPAs, enfrentam processos de biotransformação, eliminação e acumulação (Brouwer & Lee et al., 2007).

Porém, são necessários mais estudos, que trabalhem com exposições a concentrações maiores de contaminantes orgânicos, juntamente com fatores ambientais como temperatura e pH em níveis mais extremos para uma melhor compreensão do efeito destes estressores sobre as respostas de dano em DNA e LPO para confirmar os padrões observados no presente estudo.

5 CONCLUSÃO

As análises dos dados obtidos dos testes de biomarcadores das brânquias de *Mytella charruana*, foi possível a conclusão de que o pH como fator isolado afeta de forma amena danos em DNA e LPO nas duas temperaturas testadas (25°C e 27°C). Também foi possível concluir que a temperatura é um fator de grande influência para que ocorram efeitos interativos entre pH e contaminação por mistura de HPAs (Benzo[a]pireno e acenafteno) no sedimento.

Durante os experimentos padronizados realizados no laboratório, as variáveis de interesse foram controladas para melhor avaliação bioquímica, portanto esses resultados devem ser considerados com cautela, pois não representam a totalidade das condições do campo (Paskerová et al, 2012).

As concentrações da mistura de HPAs testadas não se mostraram influentes no aumento de efeitos deletérios, não provocando dano em DNA nem peroxidação lipídica no bivalve utilizado como organismo teste, mesmo em cenários com múltiplos estressores.

REFERÊNCIAS

- ASTM 2014. Designation: E1367 (Reapproved 2014) Standard test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with esturine and marine invertebrates.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. 254:246-254.
- Breitbart, D.L., Baxter, J.W., Hatfield, C.A., Howarth, R.W., Jones, C.G., Lovett, G.m. et al. (1998). Understanding effects of multiple stressors: ideas and challenges. In: Successes, Limitations, and Frontiers in Ecosystem Science (eds Pace, M.L. & Groffman, P.M.). Springer, New York, pp. 416–431.
- Brouwer, M., and Lee, R. F. (2007). “Responses to toxic chemicals at the molecular, cellular, tissue and organismal level,” in *The Blue Crab Callinectes Sapidus, Chapter 11*, eds V. S. Kennedy and L. E. Cronin (College Park, MD: Maryland Sea Grant Book), 485–512.
- CALABRESE EJ. Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment. *Human & Experimental Toxicology*. 2010;29(4):249-261. doi:10.1177/0960327109363973
- Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME). 2002. Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, Summary Tables.
- Carroll, M., Romanek, C.S., 2008. Shell layer variation in trace element concentration for the freshwater bivalve *Elliptio complanata*. *Geo. Mar. Lett.* 28, 369-381.
- CEPENE/IBAMA - Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros do Litoral Nordeste/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Estatística da pesca 2005 Brasil, Grandes Regioes e Unidades da Federação (2006). Acessado em 23 de novembro de 2019 em [www. IBAMA/CEPENE.gov.br](http://www.IBAMA/CEPENE.gov.br)
- CETESB. 2008. Relatório de qualidade das águas litorâneas no estado de São Paulo 2008. CETESB. São Paulo, 330p.
- Chen, H., Zhang, Z., Tian, F. *et al.* The effect of pH on the acute toxicity of phenanthrene in a marine microalgae *Chlorella salina*. *Sci Rep* **8**, 17577 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35686-9>
- CORDEIRO, R.M. Reactive oxygen species at phospholipid bilayers: Distribution, mobility and permeation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. v.1838, n 1, pp. 438-444, 2013.
- Crain, C. M., Kroeker, K., Halpern, B.S. 2008. Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems, *Ecology Letters*, 11: 1304-1315.
- Dickson, A.G. Millero, F.J. 1987. A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep-sea. Res.* 34, 173

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. Rio de Janeiro, Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 1999. 412p.

EMBRAPA, 2009. Métodos de extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostra de solo, sedimento e lodo. ISSN 1516-4691 Julho, 2009

Feng, M., Zhao, N., Wang, K., Wang, L. & Zhu, L. Toxicity of *p*-NP on *Chlorella vulgaris* and *scenedesmus obliquus* at different pH levels. *Research of Environmental Sciences* **24**, 210–215 (2011).

Ferreira, T.O., et al. (2010). Spatial patterns of soil attributes and components in a mangrove system in Southeast Brazil (São Paulo). *J Soils Sediments*. 10:995–1006. DOI 10.1007/s11368-010-0224-4

Gagné, F., Blasé, C. 1995. Evaluation of the Genotoxicity of Environmental Contaminants in Sediments to Rainbow Trout Hepatocytes. *Environ. Toxicol. Water. Qual.* 10,217-229.

Gobler, C.J.; DePasquale E.L.; Griffith A.W.; Baumann, H. 2014. Hypoxia and acidification have additive and synergistic negative effects on the growth, survival, and metamorphosis of early life stage bivalves. *PLoS One*,8;9(1):e83648.

Gregor, L. and Gruber, N.: OceanSODA-ETHZ: A global gridded data set of the surface ocean carbonate system for seasonal to decadal studies of ocean acidification, *Earth Syst. Sci. Data Discuss.* [preprint], <https://doi.org/10.5194/essd-2020-300>, in review, 2020.

Haider, F.; Falfushynska, H.; Ivanina, A.V; Sokolova, I.M. 2016 Effects of pH and bicarbonate on mitochondrial functions of marine bivalves. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 198:41-50

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press. 2007.

Halpern, B. S., Selkoe, K. A., Micheli, F. and Kappel, C. V. 2007. Evaluating and Ranking the Vulnerability of Global Marine Ecosystems to Anthropogenic Threats. *Conservation Biology*, 21: 1301-1315. doi:10.1111/j.1523- 1739.2007.00752.x

Halpern, B. S. et al 2008. A global map of human impact on marine ecosystems, *Science*. 319 (5865), 948-952.

Huang, X., Liu, Y., Liu, Z., Zhao, Z., Dupont, S., Wu, F., et al. (2018). Impact of zinc oxide nanoparticles and ocean acidification on antioxidant responses of *Mytilus coruscus*. *Chemosphere* 196, 182–195. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.12.183

IPCC, 2013. Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Stocker, T.F., et al eds.. cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Islam MS & Tanaka M (2004) Impact of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis.

Mar Pollut Bull 48: 624 -649

Jeng HA, Pan CH, Diawara N, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon–induced oxidative stress and lipid peroxidation in relation to immunological alteration. *Occup Environ Med.* 2011;68(9):653–658.

Kikuchi, T. et al. 2021. Status and trends of Arctic Ocean environmental change and its impacts on marine biogeochemistry: findings from the ArCS project. *Polar Science*

Knezovich, J. P. 1994. Chemical and biological factors affecting bioavailability of contaminants in seawater, p. 23–38. In J. L. Hamelink, P. F. Landrum, H. L. Bergman, and W. H. Benson (eds.). *Bioavailability: Physical, Chemical, and Biological Interactions*. Lewis publishers, Boca Raton, Florida.

Knutzen, J. Effects of decreased pH on marine organisms. *Marine Pollution Bulletin* **12**, 25–29 (1981).

Kristy J. Kroeker; Rebecca L.Kordas; Ryan N. Crim; Gerald G. Singh. Meta- analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecology Letters*, (2010)13: 1419–1434

KROEKER, Kristy J; Micheli, Florenza; Gambi, Maria Cristina; Martz, Todd R (2011): Seawater carbonate chemistry and benthic marine community during experiments, 2011.

LACKNER, R. “Oxidative stress” in fish by environmental pollutants. In: Braunbeck T., Hinton D.E., Streit B. (eds) *Fish Ecotoxicology*. EXS, v. 86. Birkhäuser, Basel, 1998.

LEE, R.F & STEINERT, S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.*, 544: 43-64

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.37, n.3, p.293-303, 2001.

Martins, M., Costa, P. M., Ferreira, A. M., & Costa, M. H. (2013). Comparative DNA damage and oxidative effects of carcinogenic and non-carcinogenic sediment-bound PAHs in the gills of a bivalve. *Aquatic Toxicology*, 142–143, 85–95.

Mattson, M.P. Hormesis defined. *Ageing Res. Rev.*, 7 (2008), pp. 1-7

McCulloch, M., Falter, J., Trotter, J. Montagna, P. 2012. Coral resilience to ocean acidification and global warming through pH up-regulation. *Nature Climate Change* 2:623-627.

McKeon, S.; Björn,C.; Tunberg,G.; Johnston,C.A; Barshis, D.J. 2015. Ecological drivers and habitat associations of estuarine bivalves. *Peer J.* 3: e 1348.

Melzner F, Stange P, Trubenbach K € et al. (2011) Food supply and seawater pCO₂ impact calcification and internal shell dissolution in the blue mussel *Mytilus edulis*. *PLoS ONE*, 6, e24223.

Meng, J., Wang, W.X., Li, L., Zhang, G. Tissue-specific molecular and cellular toxicity of Pb

in the oyster (*Crassostrea gigas*): mRNA expression and physiological studie, *Aquat. Toxicol.* 198 (2018) 257–268.

Mudroch, A. Macknight, S. D. 1994. Handbook of techniques for aquatic sediments sampling. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

Murray J.W. 2004. Ocean Carbonate Chemistry: The Aquatic Chemistry Fundamentals. In: Follows M., Oguz T. (eds) *The Ocean Carbon Cycle and Climate*. NATO Science Series (Series IV: Earth and Environmental Sciences), vol 40. Springer, Dordrecht

Nogales, B.; Lanfranconi, M. P. Juana M. Piña-Villalonga, Rafael Bosch, Anthropogenic perturbations in marine microbial communities, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 35, Issue 2, March 2011, Pages 275–298, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00248.x>

NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council, 1987. Biological markers in environmental health research. *Environ. Health Perspect.* 74, 3/9

Paskerova H, Hilscherova K, Blaha L. 2012. Oxidative stress and detoxification biomarker responses in aquatic freshwater vertebrates exposed to microcystins and cyanobacterial biomass. *Environ Sci Pollut Res* 19:2024–2037.

Petrovic, M., Barceló, D., 2004. Seeking harmonisation in assessing sediments and dredged materials. *Trend. Anal. Chem.* 23, 10–12.

Pierrot, D. et al. 2006. CO2SYS Dos program developed for CO₂ system calculations. ORNL/CDIAC-105. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Lab., US Dept of Energy, Oak Ridge, TN, USA.

Portner, H.O.; Knust, R. 2007. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 315, 95-97.

Przeslawski, R.; Byrne, M.; Mellin, C. 2015. A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. *Global Change Biology*. Vol. 21, Pages 2122-2140

Regoli, F., Principato, G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers *Aquat. Toxicol.*, 31 (1995), pp. 143-164

Ringwood, A.H.; Keppler, C.J. 2002. Water quality variation and clam growth: Is pH really a non-issue in estuaries? *Estuar. Coasts* 25(5):901-907

Rossi, M. e de Aguiar Mattos I. F. 2002. Solos de mangue do estado de São Paulo: caracterização química e física. *Revista do Departamento de Geografia*, 15, 101–113.

Sabine, C.L., et al 2004. The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science* 305:367- 371.

Stegeman, J.J., et al., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.M., Bergman, P.M. (eds.) *Biomarkers: Biochemical, Physiological and*

Histological markers of Anthropogenic Stress, Lewis Publishers, Boca Raton

Tiedke, J., Cubuk, C. and Burmester, T. (2013). Environmental acidification triggers oxidative stress and enhances globin expression in zebrafish gills. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441, 624-629.

Torres, R. J. et al. 2015. A critical comparison of diferente approaches to sediment- quality assessments in the Santos estuarine system in Brazil. *Arch Environ Contam Toxicol* 68: 132-147.

TRICART, J. (1977) *Ecodinâmica*. Rio de Janeiro. IBGE, Diretoria Técnica, SUPREN. Recursos Naturais e Meio Ambiente, v.1. 191 p.

UNEP / Secretariat of the Convention on Biological Diversity. An Updated Synthesis of the Impacts of Ocean Acidification on Marine Biodiversity. CBD Technical Series nº 75, 2014

USEPA. 1996. Method 3050B: Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils, Revision 2.

USEPA. 1996. Method 3510C: Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction, part of Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. 8p.

USEPA. 1998. Method 6020A (SW-846): Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry," Rev. 1.

USEPA. 1998. Method 8270D (SW-846): Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry (GC/MS), Rev. 4. 62 p.

USEPA. 2007. Method 3550C: Ultrasonic Extraction, part of Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. 17p.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Vol. 13, paginas 57-149

Widdicombe, C.E. et al., 2010. Laboratory experiments and benthic mesocosm studies. In Guide to best practices for ocean acidification reseach and data reporting. In: Riebesell, U., et al. ed. Luxembourg: Publications Office of the European Union.

WILHELM FILHO, D. et al. The effect of pulp mill effluent on two fish species. Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components. Curitiba: PR, p.612 – 619, 1997.

Wills, E.D. 1987. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: Snell K, Mullack, B. eds. *Biochemical toxicology: a practical approach*. IRL Press, Oxford

Yang, G., Song, L., Lu, X., Wang, N., Li, Y. Effect of the exposure to suspended solids on the enzymatic activity inthe bivalve *Sinonovacula constricta*. *Aquaculture and Fisheries* 2 (2017) 10-17.

Yao, Cui-Luan; Somero, George. 2014. The impact of ocean warming on marine organisms. *Chinese Science Bulletin*. Vol. 59 (5-6): 468-479.

Zebral, Y.D., Fonseca, J.S., Marques, J.A., Bianchini, A. Carbonic anhydrase as a biomarker of global and local impacts: insights from calcifying animals. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. 20, 3092. doi:10.3390/ijms20123092

Zeng, X. et al. 2015. The positive relationship between ocean acidification and pollution. *Mar. Pollut. Bull.* 15, 91(1): 14-21.

Zhigacheva IV, Burlakova EB, Evseenko LS, et al. Humoral immunity: polycyclic aromatic hydrocarbons and nitrosamines. *Dokl Biol Sci* 2002; 383:120 e 2.

